

PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Patentavdelningen

PCT/SE 98/02164	
REC'D 17 FEB 1999	
WIPO	PCT

09/582741

22/07

Intyg
Certificat

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

EAJU

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

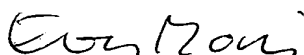
(71) Sökande Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala SE
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 9704933-2
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1997-12-30
Date of filing

Stockholm, 1999-02-11

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office


Evy Morin

Avgift
Fee

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN

Postadress/Adress
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

1997 -12- 3 0

1

METOD SOM UTNYTTJAR EN NY KALIBRATOR OCH TEST KIT SOM INNEHÅLLER KALIBRATORN.

Teknikområde

5 Sätt vid metod för bestämning av en analyt i ett prov som innebär att man utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner. I metoden ingår stegen att:

- i. man bildar ett komplex som innehåller:
Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, där
 - 10 a. a. Reaktant* och Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot Analyt', och
 - b. Reaktant* är analytiskt detekterbar,varefter
 - 15 ii. man bestämmer den detekterbara signalen från Reaktant* i komplexet (provvärde), och
 - iii. man erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra provvärdet med motsvarande signal(er) (kalibratorvärde(n)) från Reaktant*, som separat fått binda till en eller flera mängder av en kalibrator (kalibratormängder), vilka var och en svarar mot en känd mängd analyt

20 (standardmängd(er)),
Analyt' är analyten som sådan (i provet) eller en analytrelaterad reaktant, d.v.s. en tillsatt biospecifik affinitetsreaktant, som ingår i komplexet i en mängd som är relaterad till
25 mängden analyt i provet. Reaktant* och Reaktant I kan binda Analyt' samtidigt. Detta innebär att de binder till rumsligt åtskilda bindningsställen.

Denna typ av analysmetoder har bland annat genomförts i s.k. flödesmatriser, varvid reaktanter inklusive analyt transporter-
30 as i ett processflöde genom matrisen (= flödesmetodik) till en detektionszon där Reaktant* fångas upp i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. Uppfångning sker via en reaktant (Fångare) som är fast förankrad till matrisen i DZ. Fångaren kan vara Reaktant I eller en reaktant, som har biospe-
35 cifik affinitet mot Reaktant I eller mot en annan reaktant, vilken i sin tur, eventuellt via en eller flera ytterligare reaktanter, har biospecifik affinitet mot Reaktant I.

Med reaktanter (inkluderande analyt), som uppvisar biospecif
 fik affinitet (bioaffina reaktanter) avses enskilda medlemmar i
 reaktantparen: antigen/hapten - antikropp; biotin-avidin/
 streptavidin; två komplementära enkelkedjor av nukleinsyra etc.
 5 Till antikroppar räknas antigen-bindande antikroppsfragment så-
 som Fab, $F(ab)_2$, enkelkedje Fv antikroppar (scFv) etc. Aktuel-
 la reaktanter behöver inte vara naturligt förekommande utan kan
 även vara syntetiskt framställda molekyler/bindare.

Den aktuella typen av testmetodik har tidigare främst utnytt-
 10 jats för biospecifika affinitetsreaktanter där minst den ena i
 ett utnyttjat reaktantpar har uppvisat proteinstruktur, spe-
 ciellt i samband med så kallade immunkemiska bestämningsför-
 faranden.

Biospecifika affinitetsreaktionerna utföres främst i vatten-
 15 haltiga medier (exempelvis vatten).

Tidigare utnyttjade kalibratorer

I konventionell teknik har kalibratoren och analyt har ofta
 båda kunnat binda till Reaktant*. Aktuella bindningsställena på
 20 kalibratoren för bindning till Reaktant* har ofta ekvivalenta
 bindningsegenskaper med motsvarande bindningsställena på analy-
 ten. Detta innebär i praktiken att kalibratoren och analyten har
 haft bindningsställena, som är strukturellt lika eller snarlika
 och korsreagerar med varandra gentemot Reaktant*.
 25 Bindningsställena som korsreagerar med varandra om en given
 reaktant är ekvivalenta.

Kalibratormängd har enligt tidigare känd teknik vanligen va-
 rit samma som standardmängd.

Kalibratorvärden, som svarar mot olika analytmängder/koncent-
 30 rationer (standardmängder), har ofta sammanställs ofta till en
 dos-responskurva (kalibreringskurva) eller en algoritm.

I begreppet "att jämföra ett provvärde med kalibratorvär-
 de(n)" har även ingått att jämförelsen kan ske med en kalibre-
 ringskurva och/eller algoritm, som svarar mot flera kalibrator-
 35 värden.

Kalibratoren och analyten har ofta varit samma substans. Un-
 dantag finnes. Vid antikroppsbestämning har en och samma kalib-

rator ofta fungerat för flera antikroppsspecificiteter förutsatt att kalibratorsubstansen valts så att den uppvisar en konstant domän av den antikropp som skall bestämmas. Se t.ex. Abbott WO 9727486.

5

Nackdelar med tidigare känd teknik.

Tidigare känd teknik har inneburit att man parallellt med prov bestämt flera kalibratorvärden genom att köra kända mängder analyt (standardmängder) på motsvarande sätt som prov. Detta i sin tur har lett till att 5-20% av alla körningar varit kalibrator-körningar. Genom att minska antalet kalibratorkörningar, eventuellt även genom att minska antalet reaktionssteg i varje kalibratorkörning, skulle man spara tid och åtgång av reagens.

- 15 Det uppstår ofta problem, som beror på att kalibrator- och provlösningar har olika egenskaper och innehåll. Detta är speciellt uttalat vid immunologiska tester där kalibratoren ofta mäts i buffert och analysen av prov görs på serum- eller plasmaprover. Skillnad i innehåll och viskositet gör att olika svar
- 20 erhålles (mäts bl.a. som "recovery" och parallellitet). I en flödesmetodik blir dessutom viskositeten extra viktig eftersom den påverkar vandrings-/flödes-hastigheten. Denna skillnad kan man kompensera för, men det gör samtidigt systemen mera känsliga för störningar och därmed ökad spridning vid analysen.
- 25 Andra problem för tester som utnyttjar flöden är att flödena kan variera beroende på fluktuationer i temperatur, fuktighet etc.

Uppfinningens mål.

- 30 Ett första mål med uppfinningen är att förbättra de kalibreringsmetoder som för närvarande används vid tester av det inledningsvis nämnda slaget.

Ett andra mål med uppfinningen är att förenkla användandet av kalibratorer, främst genom att minska åtgången av reagens som

35 behövs och/eller minska behovet av antalet mätningar för att erhålla kalibratorvärden.

Ett tredje mål med uppfinningen, speciellt i samband med flödesmetoder, är att möjliggöra kompensation för de skillnader som kan finnas mellan kalibrator- och provlösning och mellan körningar utförda vid olika tillfällen och/eller på olika 5 platser.

Uppfinningen

Vi har nu insett att dessa mål kan uppnås om kalibratoren är bunden till matrisen innan bestämning av kalibratorvärde på-
10 börjas enligt avsett protokoll. Denna typ av kalibrator kallas fortsättningsvis matriskalibrator. Uppfinningens första huvudaspekt är således en metod enligt det inledningsvis nämnda för-
farandet och har som kännetecknande drag att kalibratoren har bundits till en matris, som är olöslig i det vätskemedium i
15 vilket bindning av Reaktant* till kalibratoren sker, innan bestämning av kalibratorvärde påbörjas. Detta innebär att kalibratoren bundits till matrisen redan hos tillverkaren så att matriskalibratoren levereras som en färdig komponent i ett kit. Bindningen mellan kalibrator och matris är vanligen av annat
20 slag än den man får mellan Analyt' och Reaktant I vid körning av prov.

Matriskalibrаторer ger stora fördelar, om transport av Reaktant* till kalibratoren sker med hjälp av ett flöde (processflöde) i en så kallad flödesmatris till en zon i matrisen, som in-
25 nehåller matriskalibratoren (kalibratorzon, KZ).

Flödesmatriser

Flödesmatrisen definierar det rum i vilket reaktanterna transporteras. Matrisen kan således vara den inre ytan av en
30 enkel flödeskanal (exempelvis en kapillär), den inre ytan av en porös matris med genomgående system av flödeskanaler (porös matris) etc. Denna typ av matriser kallas flödesmatriser. Matriserna kan vara i form av monoliter, ark, kolonner, membraner, enskilda flödeskanaler av kapillära dimensioner eller samman-
35 satta system av dylika flödeskanaler etc. De kan även vara i form av partiklar som packats i kolonnhylsor, sammanpressade fibrer etc. Matrisens inre yta, d.v.s. flödeskanalernas yta,

bör vara hydrofila, så att vattenhaltiga medier (främst vatten) kan absorberas och transporteras genom matrisen. Flödeskanalernas minsta innermått (för runda kanaler mätt som en diameter) skall vara tillräcklig stor för att tillåta transport genom 5 matrisen av de reaktanter som används. Tumregeln är att lämpliga matriser finns att välja bland de som har flödeskanaler med minsta innermått i intervallet 0,4-1000 μm , med företräde för 0,4-100 μm om matrisen har ett system av sinsemellan kommu-
nicerande flödeskanaler. Flödeskanaler med minsta innermått i 10 den övre delen av det breda intervallet (upp till 1000 μm) är främst aktuella för flöden som drivs av externt pålagt tryck/sug.

Aktuella matriser är ofta uppbyggda av en polymer, exempelvis nitrocellulosa, nylon etc. Materialet i matrisen såväl som flö- 15 deskanalernas fysiska och geometriska utformning kan variera utefter flödet beroende på vad en viss del av matrisen skall utnyttjas till (Pharmacia AB WO 9622532; Medix WO 9415215).

I matrisen kan utefter flödet finnas en eller flera definierade zoner för applicering av prov, reaktanter, buffert etc 20 (A_pZ , A_rZ , A_bZ etc) och en eller flera zoner för kalibrator och/eller detektion (KZ respektive DZ).

Olika flödesmatriser, som kan användas i den aktuella typen av tester, finns beskrivna i tidigare patentpublikationer. Se t.ex. Behringwerke US 4,861,711, Unilever 8808534, Abbott US 25 5,120,643 och 4,740,468, Becton Dickinson EP 284,232 och 4,855,240; Pharmacia AB WO 9622532;

Processflöde

Flödets riktning är från en appliceringszon för prov och/el- 30 ler reaktant mot befintliga kalibrator- och detektionszoner (KZ respektive DZ). Exakt vilka zoner processflödet skall passera bestäms av aktuellt testprotokoll. Ett processflöde kan starta från en punkt med radiell spridning och en flödesfront i form av en cirkelperiferi eller del därav. Ett processflöde kan även 35 starta från en zon i form av ett band och ha rak flödesfront vinkelrät mot flödesriktningen.

I en mindre föredragen variant utgår processflödet från en appliceringszon för Reaktant*, som samtidigt är kalibratorzon eller detektionszon. Flödet sprids i denna variant helst radiellt ut från appliceringszonen och passerar eventuellt ytterligare kalibratorzoner och/eller detektionszoner.

Flöde genom matriserna kan åstadkommas genom kapillärkrafters inverkan, exempelvis genom att man startar med en i huvudsak torr matris. Som hjälp kan en sugande kropp vara placerad i slutändan av flödet. Med hjälp av ett pålagt elektriskt fält kan lösta komponenter transporteras från appliceringszon till detektions-/kalibratorzon.

Flödet, som utnyttjas, är helst lateralt, d.v.s. parallellt med matrisens ovanyta. Även andra typer av flöden, exempelvis djupled i matrisen, kan användas.

15

Kalibrator- och detektionszoner i flödesmatriser

Flödesmatrisen som användes i den föredragna utförandeformen uppvisar en eller flera distinkta zoner med kalibrator (kalibratorzoner, KZ1, KZ2, KZ3 etc). Varje kalibratorzon innehåller matriskalibrator i en mängd, sådan att mätsignalen från Reaktant* (kalibratorvärde), som fångas upp i zonen när flöde passerar, entydigt svarar mot en viss mängd analyt i provet (standardmängd).

Kalibrator kan väljas på samma sätt som man tidigare valt kalibrator för de aktuella typerna av tester. Om man utnyttjar flödesmetodik och arrangerar så att provet (analyten) transporteras genom en kalibratorzon bör kalibratören vara vald så att den ej binder till analyten. Om kalibratören kan binda analyt ställer det speciella krav på kalibratorzonens läge i förhållande till appliceringszonen för prov. Se nedan.

Mängden kalibrator som bundits i en kalibratorzon behöver inte vara densamma, som den standardmängd den svarar mot. Detta beror på att bindningsaktiviteten gentemot Reaktant* ofta förändras, när kalibratorsubstans bindes till en matris.

Vill man bestämma antikroppar med olika specificitet men från samma art, av samma Ig- eller Ig-subklass är det föredraget att kalibratören uppvisar ett bindningställe som är unikt för arten,

klassen, eller subklassen. Detta betyder som regel att en kalibrator för bestämning av antikroppar uppvisar en epitop som finns i en konstant domän av de aktuella antikropparna, för mammalieantikroppar främst en del av Ig(Fc).

5

En och samma matris kan uppvisa en eller flera detektionszoner (DZ1, DZ2, DZ3 etc) tillsammans med en eller flera kalibratorzoner. I detektionszonen kan komplex innehållande Analyt* och Reaktant* bindas till matrisen via den inledningsvis nämnda

10 Fångaren, som är fast förankrad i en DZ.

Finns flera kalibrator- och/eller detektionszoner i samma flödesmatris, uppnås de största fördelarna med uppfinningen, om flera av zonerna finns utefter samma processflöde.

Finns flera detektionszoner (DZ1, DZ2, DZ3 etc) i en och samma matris kan dessa svara mot olika analyter. För analyter som har ekvivalenta bindningsställen kan man utnyttja samma kalibrator. Saknar analyterna ekvivalenta bindningsställen födras en kalibrator för varje analyt. Enklarest blir det om alla analyterna har samma ekvivalenta bindningsställe. Samma kalib-
 15 rator, samma kalibratorzoner och samma Reaktant* kan då utnyttjas för alla analyter.

Kalibratorzoner och detektionszoner kan geometriskt vara utformade på olika sätt (rektangulära, cirkulära, linjära, prickformade etc). Relativt varandra kan zonerna ha olika konfigurationer. Bra konfigurationer är sådana i vilka ett gemensamt flöde
 25 konsekutivt eller samtidigt penetrerar flera zoner, speciellt zoner av olika slag (DZ och KZ). Exempel på konsekutiv penetration är parallella zoner placerade efter varandra i samma processflöde. Exempel på samtidig penetration är zoner placerade
 30 bredvid varandra på samma cirkelperiferi med processflödet radiellt spritt från centrum av motsvarande cirkel. Eventuellt kan kombinationer av dessa varianter användas, d.v.s att det förutom zoner på en cirkelperiferi även finns zoner på periferin av cirkel som är koncentrisk till den först nämnda cirkelperiferin. Samtidig penetration kan även uppnås vid rak flödesfront med detektions- och kalibratorzoner, som ligger bredvid varandra på samma avstånd från processflödets startpunkt.

Om flera detektionszoner- och/eller kalibratorzoner ligger i samma processflöde, kan mätsignal för dessa zoner erhållas i en och samma testkörning/reagensapplicering. Finns flera kalibratorzoner i samma processflöde kan en dos-responskurva (kalibre-
5 ringskurva) eller algoritm sättas upp för värden erhållna för samma applicering av Reaktant*. En kalibratorzon som finns tillsammans med en detektionszon i samma flöde kan fungera som en positiv intern kalibrator (PIK).

I en variant utnyttjar man en matris, som uppvisar minst en
10 kalibratorzon (KZ1, KZ2, etc (positiva interna kalibratorer)) och minst en detektionszon (DZ1, DZ2, etc) i kombination med ett eller flera separat erhållna kalibratorvärden. De separat erhållna kalibratorvärdena behöver inte hänföra sig till samma
15 betingelser, som provet skall köras under. I den mån separata kalibratorvärden, kalibreringskurva och algoritm är avsedda att användas under en längre tid talar man om master-värden, master-kurva respektive master-algoritm.

Användningen av separat erhållna kalibratorvärden innebär att man:

- 20 i. låter prov och Reaktant* passera en detektionszon (DZ) och en positiv intern kalibrator (PIK, KZ) i en matris, som uppvisar både DZ och KZ,
- ii. bestämmer mätsignalen från en KZ (PIK-värde, KZ) och från DZ,
- 25 iii. jämför PIK-värdet med motsvarande separat erhållna kalibratorvärde(n), varvid eventuella avvikelser är ett mått på avvikelser mellan de betingelser, vid vilka provet körts, och de standardbetingelser, som gäller för det/de separata kalibratorvärdet(ena),
- 30 —iv.—anpassar den-uppmätta signalen för provet (provvärdet) till de betingelser som gäller för de separat erhållna kalibratorvärdena,
varefter man
- v. erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra den
35 anpassade mätsignalen för provet med det/de separata kalibratorvärdet(ena).

Alternativt kan man anpassa de separata kalibratorvärdena till avvikelser i betingelser och sedan direkt jämföra uppmätt provvärde med anpassade kalibratorvärden. Detta är ekvivalent med stegen (iv) och (v) ovan (kallas vice versa i patentkrav).

- 5 I stegen (iv) och (v) ingår givetvis att som alternativ anpassa motsvarande kalibreringskurva eller algoritm för att beräkna analytnivån genom att jämföra provvärdet med endera av dem.

Kalibrator- och detektionszon i samma processflöde kommer att minska tidigare felkällor som berott på skillnader i prov och
10 kalibrator. Positiv intern kalibrator och flera kalibratorzoner i samma processflöde kompenserar helt eller delvis för variationer i flöden mellan enskilda körningar. Spridningen i mätresultatet bör kunna bli lägre då såväl interna som externa faktorer kan kompenseras bort helt eller delvis. Problemet med att
15 prov och kalibrator har olika sammansättning undanröjs. För närpatienttester kommer den interna kalibratoren att kunna ge en väl definierad gräns för vad som är ett positivt svar samt ge den kvalitetssäkring, som idag saknas för dessa typer av tester.

- 20 Förankringen av kalibratoren till matrisen kan vara via kovalent bindning eller via fysikalisk adsorption, biospecifik affinitet etc. Liksom i tidigare teknik inom området kan uppfinningen utnyttja kombinationer av bindningstyper, exempelvis kovalent bindning till matrisen av en biospecifik affinitetsreak-
25 tant riktad mot kalibratoren. Speciellt kan nämnas fysikaliskt adsorberad eller kovalent bundet streptavidin i kombination med biotinylerad kalibrator, eller en på liknande sätt bunden antikropp, som är riktad mot kalibratoren. Förankring av kalibratoren till matrisen kan ske via partiklar som deponerats i/på matris-
30 en och till vilka kalibratoren är kovalent, fysikaliskt adsorptivt eller biospecifikt etc bunden. Partiklarna fäster till matrisen antingen därför att deras storlek valts så att de ej kan transporteras genom matrisen eller också via fysikalisk adsorption. Se bland annat Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP
35 472,376; Hybritech EP 437,287 och EP 200, 381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 9406012.

Fångaren kan vara bunden till en detektionszon enligt samma principer som för kalibrator. I ett och samma processflöde kan kalibrator och Fångare vara bundna till sina respektive zoner på samma eller olika sätt.

5

Appliceringszon för prov (A_pZ).

Appliceringszonen för prov kan ligga uppströms eller nedströms kalibratorzoner, med företräde för uppströms. För det fall att matriskalibratoren är vald, så att den binder analyt
10 måste appliceringszonen för prov ligga nedström matriskalibratoren. Relativt detektionszoner skall appliceringszonen för prov i praktiska utförandeformer alltid ligga uppströms.

I vissa mindre föredragna utförandeformer kan man tänka sig applicering av prov i en kalibrator- eller detektionszon.

15

Appliceringszon för Reaktant* (A_RZ) och andra biospecifika affinitetsreaktanter (A_RZ).

Appliceringszon för Reaktant* (A_RZ) bör alltid ligga uppströms kalibratorzonerna.

20 Finns detektionszon i processflödet skall ordningen av appliceringszonerna för biospecifika affinitetsreaktanter säkerställa att Analyt' transporteras in i sin detektionszon före eller samtidigt med Reaktant*. En eller flera reaktanter kan tillsättas i samma appliceringszon. Om appliceringszonen är
25 gemensam för prov och minst en reaktant, förslagsvis Reaktant*, kan applicering ske samtidigt, t.ex. genom att prov och en reaktant blandats innan de appliceras i zonen. Vid behov kan blandningen förinkuberas så att reaktanten på avsett sätt binder till analyten eller andra komponenter i provet innan appli-
30 cering. Fackmannen kan med kunskap om olika protokoll lätt bestämma vilka zoner han behöver och i vilken ordning de kan ligga.

Om Reaktant I är i löst form har matrisen en appliceringszon för denna samtidigt, som det finns en Fångare fast förankrad i
35 detektionszonen. Om Fångaren fodrar ytterligare biospecifika affinitetsreaktanter för att kunna binda Reaktant* (se under

rubriken "Teknikområde"), finns appliceringszoner för dessa reaktanter. Appliceringszonener för Reaktant I, när den ej är fångare, och eventuella ytterligare reaktanter måste i vara placerade så att Reaktant I når detektionszonen före eller 5 samtidigt med Analyt'.

I vissa mindre föredragna utförandeformer kan biospecifika affinitetsreaktanter (inklusive Reaktant*) appliceras i en kalibrator- eller detektionszon. Jämför under rubriken "Processflöde".

- 10 Reaktanter som utnyttjas i metoden kan vara fördeponerade i sin respektive zon eller tillsättas i samband med att bestämningssmetoden utföres. Fördeponering innebär att reaktanten ifråga applicerats i förväg på sådant sätt att den ej sprider sig utanför sin appliceringszon förrän flöde av vätska initie- 15 ras i eller passerar zonen.

Fördeponering av reaktanter kan ske på i och för sig känt sätt. Se till exempel (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 8808534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232). Det är viktigt att man tar hänsyn till att en fördeponerad reaktant 20 lätt skall gå i lösning när vätskapasserar genom den aktuella appliceringszonen. För att uppnå snabb upplösning är det vanligt att man inkorporerar/samdeponerar reaktanter i/med substanser som snabbt går i lösning. Denna typ av substanser är ofta hydrofila med polära och/eller laddade grupper, såsom 25 hydroxy, karboxy, amino, sulfonat etc. Speciellt kan nämnas hydrofila snabblösliga polymerer, exempelvis med kolhydratstruktur, enkla socker inkluderande mono-, di- och oligosackarider och motsvarande sockeralkoholer (mannitol, sorbitol etc). Vanligt är att man först belägger den aktuella applice- 30 ringszonen med ett skikt av den snabblösliga substansen, varefter reaktanten appliceras, eventuellt följt av ytterligare ett skikt snabblöslig substans. Ett alternativt sätt är att inkorporera reaktanten i partiklar av snabblösligt material som sedan deponeras i aktuell zon av matrisen.

35

Zoner för buffert (A_pZ).

Nödvändiga buffertsystem kan ingå i lösningar som tillsättes samtidigt med prov och reaktanter. Enligt konventionell teknik sker tillsats av buffert i den appliceringszon, som är belägen uppströms alla övriga appliceringszoner. Detta har ofta varit detsamma som provpåsättningszon. I föreliggande uppfinning kan buffert i princip tillsättas i valfri position utefter transportflödet. Se nedan.

I en parallellt inlämnad patentansökan "Analysförfarande med tillsättning i två eller flera positioner" beskrivs en uppfinning, som i en variant ger en föredragen utförandeform av föreliggande uppfinning. Denna patentansökan inkorporeras härmed "by reference" i föreliggande text. Uppfinningen i denna separata patentansökan baserar sig på upptäckten, att vätska från två efterföljande zoner (AZ2 och AZ1) i en flödesmatris kan vandra efter varandra utan att blanda sig. Detta uppnås om man applicerar vätska till den nedströms belägna zonen (AZ1) före eller i huvudsak samtidigt med vätska till den uppströms belägna zonen (AZ2). Denna upptäckt har lett till att man kan uppnå zonvis vandring av eventuella reaktanter, som finns vätskorna, mot en detektionszon. Placeras appliceringszonen för prov (A_pZ) nedströms appliceringszonen för Reaktant* (A_RZ) och vätska appliceras till A_RZ och (A_pZ) kan provet (analyten) vandra in i detektionszonen innan vätskan, som innehåller Reaktant*, gör det. Har man en appliceringszon för enbart vätska (buffert) (A_BZ) mellan (A_RZ) och (A_pZ) får man en tvätt av detektionszonen DZ mellan uppfångning av analyt och Reaktant*. En dylik mellanliggande buffertzona (A_BZ) kan också säkerställa att en reaktant (inklusive analyt), som är applicerad i en nedströms belägen zon, når DZ före en reaktant, som startar från en uppströms belägen appliceringszon. Detta senare kan vara viktigt om matrisen i sig retarderar reaktanten som applicerats i den nedströms belägna zonen.

Reaktanter kan ingå i den vätska som appliceras till en zon. Alternativt kan de vara fördeponerade i den zon som motsvarande vätska skall appliceras eller i en zon som ligger mellan denna

och närmast nedströms liggande zon för applicering av vätska. Prov (analyten) appliceras som regel i form av vätska.

Denna utförandeform av uppfinningen är speciellt intressant för sekventiella metoder av den aktuella typen i flödesmatriser, d.v.s. förfaranden i vilka matrisen förutom kalibratorzon även innehåller detektionszon, och där Provet/analyten skall transporteras in i detektionszonen före vätska, som innehåller Reaktant*.

10 Analytiskt detekterbar reaktant (Reaktant*).

Vanligen erhålles analytisk detekterbarhet för en reaktant genom att den är utrustad med en analytiskt detekterbar grupp. Välkända exempel på ofta använda grupper är enzymatiskt aktiva grupper (enzym, kofaktor, koenzym, enzymsubstrat etc), fluoro-
15 fora, kromofora, kemilumiscenta, radioaktiva grupper etc. Även grupper som påvisas med hjälp av en biospecifik affinitetsreaktant brukar räknas hit, exempelvis biotin, haptent, Ig-klass-, Ig-subklass- och Ig-artspecifika determinanter etc. Speciellt bra i uppfinningen har det visat sig vara med partiklar vars
20 yta belagts med en biospecifik affinitetsreaktant. Partiklarna kan innehålla någon av nyss nämnda detekterbara grupper, såsom fluorofores grupper, eller vara färgade (= innehåller kromogena grupper). Användbara partiklar har ofta en storlek i intervallet 0,001-5 μm med företräde för 0,01-5 μm . Partiklarna kan va-
25 ra sfäriska och/eller monodispersa eller polydispersa. De kan vara av kolloidala dimensioner, s.k. sol (d.v.s. vanligen sfäriska och monodispersa med storlek i intervallet 0,001-1 μm). Välkända partikulära markörgrupper är metallpartiklar (exempelvis guldsol), icke-metallpartiklar (exempelvis SiO_2 , kol, latex
30 och avdödade erythrocyter och bakterier). I vissa fall har man betonat att partiklarna skall vara icke-sedimenterbara under utnyttjade betingelser (Se Pharmacia AB, WO 9622532).

Se ytterliggare Unilever, WO 8808534; Abbott, US 5,120,643; Becton Dickinson, EP 284,232.

I samband med utvecklingsarbetet av matriskalibratorer har vi överraskande funnit att bra resultat kan erhållas om man samtidigt utnyttjar:

- 5 (a) Reaktant* där den detekterbara gruppen är partiklar enligt ovan och
- (b) En detektionszon i vilken Fångaren fäster till matrisen via partiklar (förankringspartiklar), som har dimensioner som skulle tillåta transport av partiklarna genom matrisen.
- 10 Vi har uppnått fungerande system där markörpartiklar och förankringspartiklar haft i huvudsak samma dimension vilket innebär att med all sannolikhet kan markörpartiklarna vara större än förankringspartiklarna och vice versa så länge som de bara är mindre än de flödeskanaler som matrisen definierar. Systemet
- 15 kan fungera såväl med som utan fördeponering av Reaktant*. Denna utförandeform beskrives närmare i en samtidigt med denna ansökan inlämnad patentansökan "Analysmetod med partiklar". Även denna ansökan är inkorporerad "by reference". Applicerat på föreliggande uppfinning innebär detta att Reaktant* har partik-
- 20 lar som analytiskt detekterbar grupp enligt a ovan och att kalibratoren och/eller Fångaren binder till matrisen via partiklar enligt b ovan.

Aktuella testprotokoll.

- 25 Uppfinningen kan främst appliceras på icke-kompetitiva (icke-inhibition) testvarianter, men även på kompetitiva (inhibition) testvarianter om dessa innebär att ett komplex bildas med en analyt-relaterad reaktant bunden mellan Reaktant I och Reaktant*. Protokollen kan köras som simultana eller sekventiella
- 30-varianter. Med simultana metoder avses att Reaktant* och Analyt' samtransporteras under minst en del av transporten mot detektionszonen och helst när denna samtidigt. Med sekventiell metod avses att Analyt' under minst en del av transporten mot detektionszonen vandrar före Reaktant* och helst när detek-
- 35 tionszonen före Reaktant*. Illustrativa exempel ges nedan. "--" avser fast förankring till matrisen från början. "---" avser bindning via biospecifik affinitet". Det har förutsatts att

reaktanterna är monofunktionella med avseende på de bindningsställen som utnyttjas.

A. Sandwich-protokoll: Reaktant I (= Fångare) och Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten (= Analyt'). x är antal mol Reaktant I på matrisen. y är antal mol Analyt' (= mol Reaktant*), som fångats upp på matrisen via Reaktant I. Bildat komplex:

Matris[-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I ---Analyt'---Reaktant*]_y

10

B. Sandwich-protokoll: Reaktant II (= Fångare) har biospecifik affinitet mot Reaktant I som i sin tur har biospecifik affinitet mot analyten (= Analyt'). Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten. x är antal mol Reaktant II på matrisen. y är antal mol Analyt' (= mol Reaktant*) som fångats upp på matrisen via Reaktant II---Reaktant I. z + y är antal mol Reaktant I som fångats upp på matrisen via Reaktant II. Bildat komplex:

Matris[-Reaktant II]_{x-z-y}[-Reaktant II---Reaktant I]_z[-

Reaktant II---Reaktant I---Analyt'---Reaktant*]_y

20

C. Protokoll av inhibitionstyp: Reaktant I är analytanalog (= Fångare) och har bindningsställen som är ekvivalenta med bindningsställen på analyten. Analyt' är en reaktant som har biospecifik affinitet mot analyten och mot Reaktant I. Reaktant* har biospecifik affinitet mot Analyt'. Analyt' ingår i det bildade komplexet i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. X är antal mol Reaktant I på matrisen. y är antal mol Analyt' (= antal mol Reaktant*), som fångats upp på matrisen via Reaktant I.

30

Bildat komplex:

Matris[-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I---Analyt'--- Reaktant*]_y

Analyter i prov

35 Uppfinningen är främst avpassad för att bestämma biospecifika affinitetsreaktanter (analyter) av de inledningsvis nämnda sla-

gen. Stora fördelar erhålles för analyter som förekommer i multipla former, vilka som gemensam nämnare har minst ett bindningsställe med ekvivalenta bindningsegenskaper.

För icke-kompetitiva metoder (sandwich) kan analyten vara en antikropp riktad mot ett antigen (inklusive allergen) eller haptent (Testprotokoll A och B ovan). Reaktant I är i detta fall antigenet eller haptentet mot vilket antikroppen är riktad, och Reaktant* är en antikropp riktad mot analyten. Alternativt är Reaktant* antigenet eller haptentet, och Reaktant I är antikropp riktad mot analyten. För icke-kompetitiva metoder kan analyten även vara ett antigen, varvid Reaktant* och Reaktant I är antikroppar riktade mot antigenet. Som exempel på analyt-antigen kan nämnas immunglobulin eventuellt av viss Ig-klass eller Ig-subklass. Reaktant* respektive Reaktant I kan, när analyten är en antikropp eller ett immunglobulin, uppvisa biospecifik affinitet mot en Ig-determinant, som är specifik för en Ig-klass, såsom IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM, och/eller för en subklass om sådan finns (exempelvis IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4), och/eller för en viss art. Detta innebär att Reaktant* respektive Reaktant I vanligen är en antikropp som uppvisar någon av dessa specificiteter, när analyten är en antikropp eller ett immunglobulin..

Kompetitiva varianter är främst applicerbara på analyter, som är lågmolekylära. I testprotokoll C ovan kan analyten vara ett antigen/haptent varvid Reaktant I är antigenet/haptentet bundet till matrisen, Analyt' är en antikropp riktad mot antigenet/haptentet, och Reaktant* är en antikropp riktad mot Analyt'.

För uppfinnarna har det varit speciellt intressant att kunna mäta analyter vars förekomst och/eller mängd är relaterad till autoimmun sjukdom och allergi. Speciellt intressant är att mäta anti-allergen antikroppar av IgE- eller IgG-klass, för de senare gärna med tonvikt på någon av de nämnda subklasserna. Mätning av allergen-specifika antikroppar kan utnyttjas i samband med diagnosticering av IgE-medierad allergi.

35

Prover

Aktuella prover kan vara av biologiskt ursprung exempelvis från olika kroppsvätskor (helblod, serum, plasma, saliv, urin, tårvätska, cerebrospinalvätska etc), extrakt från biologisk vävnad, från cellodlingsmedier, uppdriftningsförfaranden inom bioteknik, från livsmedel, från miljön (miljöanalysprover) etc. Proverna kan vara förbehandlade för att passa till exempelvis matrisen, testprotokollet som ingår etc.

En andra aspekt av uppfinningen

- 10 Denna aspekt av uppfinningen avser ett testkit där matriska-
libratorn utgör en central punkt. Matriska-
libratorn användes i
analysmetoder för att överföra uppmätta signalvärden (provvär-
den) för komplexbunden analytiskt detekterbar reaktant (=Reak-
tant*) till reala mängder analyt i ett prov i samband med att
15 man utför en analysmetod som utnyttjar biospecifika affini-
tetsreaktioner. Liksom i metodaspekten komplexbindes Reaktant*
i en mängd som är relaterad till mängden analyt i ett prov. Den
viktigaste typen av analysmetoder, som kitet kan användas för,
är de som uppfinningens metod användes för, d.v.s. metoder vid
20 vilka man bildar komplex som innehåller Reaktant I---Analyt'---
Reaktant*. Reaktant I, Analyt', Reaktant* och --- har samma be-
tydelse som i metodaspekten.

Kitet kännetecknas av att det uppvisar:

- a) en flödesmatris, i vilken det finns ett område för pro-
cessflöde för transport av Reaktant*, och att det i det-
25 ta område finns
i. en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2 etc), som
innehåller en till matrisen fast förankrad kalib-
rator, varvid mängderna kalibrator är olika för
30 minst två kalibratorzoner och kalibratoren uppvisar
bindningsställen till vilka Reaktant* kan binda, när
Reaktant* transporteras genom en kalibratorzon, samt
ii. uppströms nämnda en eller flera kalibratorzoner en
appliceringszon för Reaktant* ($A_R.Z$), och
35 b) Reaktant*, som eventuellt är fördeponerad i $A_R.Z$.

Processflödet kan även innehålla (a) en detektionszon (DZ), som är belägen nedströms eller sammanfaller med $A_R.Z$ och i vilken det finns en fast förankrad Fångare via vilken Reaktant* kan binda till DZ, samt (b) en appliceringszon för prov ($A_p.Z$), 5 som är belägen uppströms eller sammanfaller med nämnda DZ. $A_R.Z$ kan ligga uppströms eller nedströms eller sammanfalla med $A_p.Z$ (om den finns), med företräde för uppströms eller nedströms. Om $A_p.Z$ och DZ finns i samma processflödet som kalibratorzonerna, så ligger $A_p.Z$ helst uppströms och DZ helst nedströms befintliga 10 kalibratorzoner.

Den fast förankrade reaktanten (Fångaren) har i föredragna utförandeformer biospecifik affinitet mot analyten eller en analytrelaterad reaktant, som kan vara analytiskt detekterbar. Analytrelaterad reaktant är främst aktuellt för kompetitiva 15 testvarianter.

Kalibratorsubstans väljes på samma sätt som i metodaspekten av uppfinningen. För de fall att vald kalibratorsubstans uppvisar biospecifik affinitet mot analyten skall motsvarande kalibratorzon ligga uppströms $A_p.Z$.

20 Ytterligare detaljer om kalibratorer, zoner, reaktanter, matriser, processflöden, testprotokoll, prover etc framgår ur beskrivningen för metodaspekten av uppfinningen.

Uppfinningen skall nu åskådliggöras med ett antal exempel som 25 visar olika bästa utförandeformer av densamma. Uppfinningen definieras av bifogade patentkrav och av det som framgår av beskrivningen.

PATENTEXEMPEL 1: BESTÄMNING AV BJÖRKSPECIFIK IgE MED KOLPARTIKELKONJUGAT OCH MED KALIBRATOR BUNDEN TILL MATRISEN.

Metoder och material

Adsorption av fenyl-dextran till polystyrenpartiklar: Fenyl-
 5 dextran (substitutionsgrad: 1 fenylgrupp på var femte monosacka-
 ridenhet = 20 %, Mw dextran 40 000, Pharmacia Biotech AB, Upp-
 sala, Sverige) adsorberades till polystyrenpartiklar (0.49 µm
 Bangs Laboratories, USA) genom end-over-end inkuberingar med
 fenyl-dextran löst i avjoniserat vatten till 1) 5 mg/ml, 10 %
 10 partikelsuspension, RT 1h 2) 5 mg/ml, 5% partikelsuspension,
 RT 1 h 3) 20 mg/ml, 1% partikelsuspension, RT över natt 15 h.
 Partiklarna tvättades därefter två gånger med avjoniserat vat-
 ten. Partikelsuspensionerna centrifugerades mellan varje inku-
 bering och tvätt (12100xg, 25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10 000
 15 rpm). Partikelsuspensionen sonikerades slutligen (Ultraljuds-
 bad, Branson 5210, 5 min).

Koppling av humant IgE (hIgE) till polystyrenpartikel (= hIgE-partiklar): Humant IgE kopplades till fenyl-dextranbelagda
 20 polystyrenpartiklar med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-pyridinium
 bromid (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-
 210).

Avsaltning och buffertbyte av hIgE utfördes genom gelfiltre-
 ring (PD-10, Pharmacia Biotech AB) i NaHCO₃, 0,1 M, pH 8,5. 278
 25 mg polystyrenpartiklar (enligt ovan) i 2% lösning i 30 vol%
 aceton aktiverades med 4,2 ml CDAP (0,44 M) och 3,4 ml TEA (0,2
 M trietylamin, Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP tillsattes under
 omrörning 60 sek och TEA under 120 sek. Partiklarna tvättades
 med 30 vol% aceton och centrifugerades vid 12100xg (25 min,
 30 Beckman, J-21, JA-20, 10 000 rpm). 25 mg hIgE kopplades till de
 aktiverade partiklarna vid inkubering end-over-end över natt
 +4°C. Därefter centrifugerades partiklarna innan avaktivering
 med glutaminsyra 0,05 M och asparbinsyra 0,05 M i NaHCO₃-buf-
 fert. Inkubering end-over-end över natt +4°C. Kopplade partik-
 35 lar tvättades med 0,1 M NaHCO₃ och två gånger med 20 mM borat-
 buffert pH 8,5. Partikelkoncentration bestämdes spektrofoto-
 metriskt vid A₆₀₀ nm med obehandlade partiklar som referens.

Kopplad protein-koncentration bestämdes genom att ha radioaktivt humant IgE närvarande vid kopplingen och cpm-mätning.

Extraktion av t3 (björk pollen, Betula verrucosa): 1 del 5 (vikt) björkpollen (Allergon, Sverige) extraherades med 10 delar (volym) 0,1 M fosfatbuffert (benämnes 1/10), pH 7,4. Extraktionen pågick i 2 timmar på skakbord i + 4°C. Extraktet centrifugerades vid 4000 rpm i 1,75 timmar. Efter filtrering applicerades lösningen på PD-10 kolonn (Pharmacia Biotech AB) 10 och eluerades ut i 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5 (benämnes 1/14).

Koppling av t3-extrakt till polystyrenpartikel (t3-partiklar): t3 extrakt (1/14) kopplades med CDAP (Kohn and Wilchek, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210) till polystyrenpartiklar 15 belagda med fenyl-dextran. Polystyrenpartiklar (400 mg, belagda med fenyl-dextran enligt ovan) i 30 vol-% aceton, 2 % partikel-suspension, aktiverades med 60 mg CDAP (100 mg/ml i 30 % aceton) och 0,48 ml 0,2 M trietylamin (Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP tillfördes under omrörning och TEA tillfördes droppvist 20 under 90 sekunder och omrörning i totalt 120 s. Reaktionen avbröts genom tillsats av 30 % aceton (4 ggr vol) och centrifugering vid 12 400xg i 35 min. Partiklarna tvättades 1 gång med avjoniserat vatten. 32 ml t3 extrakt i 0,1 NaHCO₃, pH 8,5 tillfördes 80 mg av de aktiverade partiklarna och koppling pågick i 25 1 timme på skakbord (350 impulser/min). Därefter centrifugerades partiklarna innan de avaktiverades med 0,05 M asparaginsyra och 0,05 M glutaminsyra i 0,1 NaHCO₃, pH 8,5. Inkubering på skakbord över natt + 4°C. Partiklarna tvättades, genom centrifugering, i 1) 0,1 M NaHCO₃, 0,3 M NaCl, pH 8,5; 2) 0,1 M Na- 30 acetat, 0,3 M NaCl, pH 5; 3) 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5; och 4) 20 mM Na-borat, pH 8,5.

Partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt vid 600 nm med obelagda polystyrenpartiklar som referens.

35 Adsorption av anti-human IgE antikropp till kolpartiklar (kolpartikelkonjugat = Reaktant*): Monoklonal anti-hIgE adsorb-

erades till kolpartiklar (sp100 från Degussa, Tyskland). Se Pharmacia AB, WO 9622532. Den färdiga suspensionen, som deponerades på nitrocellulosaflak, var spädd med buffert till 400 µg kolpartiklar per ml. —

5

Deponering av t3-partiklar på membran i detektionszon: På nitrocellulosaflak med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bred) applicerades 4 % av ovan t3-kopplade partiklar med Linear Striper (IVEK Corporation) med flödet 1 µl/s och 1 µl/cm som en 10 rak zon. Flaken torkades 1 timme, 30°C, varefter flaken klipptes vinkelrät mot zonen till 0,5 cm breda remsor (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

Deponering av hIgE-partiklar kalibratorzoner: På nitrocellu- 15 losaflak med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bredd) deponerades som parallella kalibratorzoner hIgE-partiklar med Linear Striper (IVEK Corporation, USA). Flödet var 1 µl/sek och 1 µl/cm. Flak avsedda för remsor med enbart kalibratorzoner belades med sex stycken parallella zoner. hIgE-koncentrationerna 20 i zonerna var 0, 0,84; 3,4; 14; 54,2 och 217 ng hIgE/0,5 cm. Innan deponeringen utfördes späddes hIgE-partiklarna i boratbuffert (20 mM, pH 8,5, Dextran T5000 4,2 %w/w, sorbitol 5,8 %w/w). I samtliga zoner ingick även 1% fenyl-dextranbelagda partiklar för att ge samma mängd partiklar i varje zon. På separat 25 nitrocellulosaflak deponerades en zon med hIgE-partiklar (14 ng hIgE/0,5 cm, PIK = positiv intern-kalibrator) och i en parallell zon t3-partiklar enligt ovan (detectionszon). Deponeringen skedde med samma parametrar som för hIgE-partiklar. Flaken torkades 1 h, 30°C, varefter de klipptes, vinkelrät mot zonerna, 30 till remsor på 0,5 cm bredd (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic automation, USA)

Testförfarande: Remsor monterades på en plan plastyta. Upp- till (0,5 cm) på remsan placerades ett sugande membran (bredd 3 35 cm, Whatman, 17 Chr). För konstant tryck lades metalltyngder på de sugande membranen. Tio mm från nederkanten monterades en 2 mm bred Inplastor-remsa (förklustrad polyesterfilm). Implastor-

remsan skall hindra att applicerade vätskor flyter ut över för stor del av membranet. Till nederkanten av remsan applicerades 30 µl prov alternativt buffert. Efter insugning av provvolymen sattes i tur och ordning: 15 µl buffert, 15 µl kolpartikelkonjugat enligt ovan och 30+30 µl buffert. Bufferten var: natriumfosfat 0,1 M, BSA 3%, natriumazid 0,05 %, sukros 3 %, natriumklorid 0,5 %, fenyl-dextran 0,25 %, bovint gammaglobulin 0,05 %, pH 7,5. Reaktionszonernas svärtningsgrad mättes som absorbans med ultroskan (ultroskan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB).

10

Resultat

A) Aktivitetsbestämning på deponerad IgE-kalibratorkurva mot IgE kalibratorer (24°C) körda som prov på enskilda remsor med anti-hIgE antikropp i bindningszon.

15

Tabell 1:

	Deponerad mängd IgE	Beräknad KU/L	Abs (x1000) *
1	0,84	0,27	46
20 2	3,4	0,48	109
3	14	0,71	266 används nedan
som			positiv intern kalibrator
25 4	54,2	2,7	619
5	217	66,3	1882

*= absorbans på reaktionzon efter att kolpartikel-konjugat har bundit in.

30-B) Bestämning av björkspecifik IgE antikropp i patientprover körda vid 18, 24 och 37°C, med och utan positiv internkalibrator (PIK) för att justera standardkurvan (körd vid 24°C).

Tabell 2: Resultat (KU/L) med och utan korrigerad

35 kalibratorkurva:

Korrigerad			Ej Korrigerad		
18°C	24°C	37°C	18°C	24°C	37°C

Prov 1	1,3	1,1	1,4	0,83	1,1	1,8
Prov 2	6,9	5,5	6,7	5,1	8,6	20

Resultaten visar att det går att kompensera för variationen i 5 de enskilda körningarna genom att använda positiva internkalibratorer. Dessutom visar resultaten att det är möjligt att använda sig av fördeponerade kalibratorer.

Den i detta exempel visade utförandeformen kan modifieras så 10 att man uppfyller ett eller flera av följande kriterier (a) har fördeponerad Reaktant* i en appliceringszon och/eller (b) har appliceringszon för prov belägen nerströms eller uppströms appliceringszon för Reaktant*, (c) har zoner som tillåter samtidig tillsättning av Reaktant* och prov.

PATENTKRAV

1. Sätt vid metod för bestämning av en analyt i ett prov som innebär att man utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner
5 och att följande steg ingår:
 - i. man bildar ett komplex som innehåller:

Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, där

 - a. Reaktant* och Reaktant I uppvisar biospecifik
affinitet mot analyten,
 - 10 b. Reaktant* är analytiskt detekterbar,
 - c. Analyt' är analyten eller en analytrelaterad
reaktant, varefter
 - ii. man bestämmer den detekterbara signalen från Reaktant*
i komplexet (provvärde), och
 - 15 iii. man erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra
provvärdet med ett eller flera kalibratorvärden som
vart och ett svarar mot en standardmängd analyt,
20 **kännetecknat** av att man innan bestämning av kalibratorvärde
har bundit kalibratortill en matris, som är olöslig i det
vätskemedium i vilket bindning av Reaktant* till kalibra-
tortorn sker.
2. Sätt enligt krav 1, **kännetecknat** av att matriskalibratortorn
och analyten har förmåga att biospecifikt binda till Reak-
25 tant* via ekvivalenta bindningsställena.
3. Sätt enligt något av kraven 1-2, **kännetecknat** av
 - a) att matrisen är en flödesmatris som uppvisar
en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2, KZ3
30 —etc), och
 - b) att varje kalibratorzon innehåller matriskalibrator
i en mängd som svarar mot en standardmängd analyt, och
 - c) att man binder Reaktant* till kalibratortorn genom att
låta Reaktant* transporteras genom kalibratorzonerna.
- 35 4. Sätt enligt krav 3, **kännetecknat** av
 - a. att två eller flera av zonerna KZ1, KZ2, KZ3

etc med matriskalibrator ligger i samma processflöde, varvid minst två av zonerna svarar mot olika standardmängd analyt, och

- 5 b. att transport av Reaktant* för bindning till matriskalibrator i de olika KZ sker via detta processflöde.

5. Sätt enligt krav 3, **kännetecknat** av

- 10 a. att enskilda kalibratorzoner (KZ) ligger i separata processflöden, och
b. att transport av Reaktant* för bindning till matriskalibrator i en kalibratorzon KZ sker via respektive processflöde.

15 6. Sätt enligt något av kraven 4-5, **kännetecknat** av

- a. att processflödet respektive processflödena saknar detektionszon, och
20 b. att man bildar komplexet i en detektionszon i ett processflöde, som saknar kalibratorzon och som finns i en matris av samma slag som kalibratorzonerna.

7. Sätt enligt något av kraven 1-2, **kännetecknat** av att matrisen är en flödesmatris och att det utefter ett och samma processflöde finns

- 25 a. en eller flera kalibratorzoner (KZ), var och en uppvisande en matriskalibrator,
b. en eller flera detektionszoner, av vilka ingen sammanfaller med någon kalibratorzon och i vilka en Fångare är fast förankrad och är antingen
30 Reaktant I eller biospecifik affinitesreakant som direkt eller indirekt kan binda Reaktant I biospecifikt, och
c. en appliceringszon för Reaktant*, $A_R.Z$, vilken ligger uppströms nämnda KZ och DZ och till vilken Reaktant*
35 kan ha fördeponerats,
d. en appliceringszon för prov ($A_P.Z$) vilken ligger i. uppströms eller sammanfaller med en detektions-

- zon,
- ii. nedströms eller uppströms eller sammanfaller
med $A_R.Z$ ($A_P.Z/A_R.Z$), och
- iii. ligger uppströms, nedströms eller sammanfaller,
5 med en kalibratorzon,
med företräde för att appliceringszonen för prov ($A_P.Z$)
ligger uppströms både detektions- och kalibratorzoner,
och att man tillsätter Reaktant* till $A_R.Z$, om Reaktant* ej
är fördeponerad, och prov till $A_P.Z$, eventuellt förblandat
10 med Reaktant* om $A_P.Z$ och $A_R.Z$ sammanfaller, så att analyt
och Reaktant* når DZ samtidigt eller att analyt når DZ före
Reaktant*
8. Sätt enligt krav 7, kännetecknat av att processflödet
15 innehåller två eller flera av nämnda kalibratorzoner.
9. Sätt enligt krav 7, kännetecknat av att processflödet
innehåller en eller två av nämnda kalibratorzoner och
att man erhåller nivån analyt i provet genom att:
- 20 a. man har tillgång till ett eller flera
separat erhållna kalibratorvärden, och
b. man jämför ett kalibratorvärde för en kali-
bratorzon (Positiv Intern Kalibrator = PIK),
som ligger i samma processflöde som nämnda
25 detektionszon, med ett eller flera av de
separat erhållna kalibratorvärdena,
c. man anpassar mätsignalen från detektionszonen
till hur mätsignalen för PIK avviker från
de separata kalibratorvärdena, varefter
30 d. man erhåller analytnivån i provet genom att den
anpassade mätsignalen från detektionszonen
jämföres med ett eller flera av de separat erhållna
kalibratorvärdena,
eller vice versa med avseende på vad som anpassas och
35 jämföres i stegen c och d.

10. Sätt enligt något av kraven 7-9, **kännetecknat** av
- a. att A_pZ är (i) gemensam med A_RZ ($= A_pZ/A_RZ$) eller
(ii) ligger uppströms A_RZ , och
 - 5 b. att för alternativ (i) prov är förblandat med Reaktant* innan det sättes till den gemensamma zonen A_pZ/A_RZ , eller prov sättes till den gemensamma zonen A_pZ/A_RZ , som innehåller fördeponerad Reaktant*, och för alternativ (ii) prov sättes till
 - 10 A_pZ , som ligger uppströms A_RZ som i sin tur innehåller fördeponerad Reaktant*.
11. Sätt enligt något av kraven 3-10, **kännetecknat** av att Reaktant*, som analytiskt detekterbar grupp har partiklar, och/
- 15 eller att kalibratoren och/eller Fångare, om detektionszon finns, är förankrad till matrisen via partiklar.
12. Sätt enligt något av kraven 1-11, **kännetecknat** av att analyten är en antikropp riktad mot Reaktant I eller mot Reaktant*, varvid
- 20 a. Reaktant* är en antikropp riktad mot analyten och Reaktant I är ett antigen/hapten, när analyten är en antikropp riktad mot Reaktant I, och
- 25 b. Reaktant* är ett antigen eller ett haptent och Reaktant I är en antikropp riktad mot analyten, när analyten är en antikropp riktad mot Reaktant*.
13. Sätt enligt något av kraven 1-11, **kännetecknat** av att analyten är ett antigen, och Reaktant* och Reaktant I är antikroppar riktade mot analyten.
- 30
14. Sätt enligt något av kraven 1-13, **kännetecknat** av att man utför metoden som en del i diagnosticering av allergi eller
- 35 autoimmun sjukdom.

15. Kit för att överföra uppmätta signalvärden för komplexbund-
en analytiskt detekterbar reaktant (=Reaktant*) till reala
mängder analyt i ett prov i samband med att man utför en
5 analysmetod, vilken utnyttjar biospecifika affinitetsreak-
tioner för att bestämma mängd analyt i ett prov för att
bilda komplex innehållande Reaktant* i en mängd som är re-
laterad mängden analyt i provet, **kännetecknat** av att kitet
uppvisar:
- 10 a) en flödesmatris, i vilken det finns ett område för pro-
cessflöde för transport av Reaktant*, och att det i det-
ta område finns
i. en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2 etc), som
innehåller en till matrisen fast förankrad kalib-

- rator, varvid mängderna kalibrator är olika för minst två kalibratorzoner och kalibratorn uppvisar bindningsställen till vilka Reaktant* kan binda, när Reaktant* transporteras genom en kalibratorzon, samt
- 5 ii. uppströms nämnda en eller flera kalibratorzoner en appliceringszon för Reaktant* ($A_R.Z$), och
- b) Reaktant*, som eventuellt är fördeponerad i $A_R.Z$.
16. Kit enligt krav 15, **kännetecknat** av att processflödet inne-
- 10 håller en detektionszon (DZ), som är belägen nedströms eller sammanfallande med $A_R.Z$ och innehåller en fast förankrad Fångare via vilken Reaktant* kan binda till DZ, samt en appliceringszon för prov ($A_P.Z$), som är belägen uppströms eller sammanfaller med nämnda DZ.
- 15 17. Kit enligt krav 16, **kännetecknat** av att $A_R.Z$ ligger uppströms eller nedströms eller sammanfaller med $A_P.Z$, med företräde för uppströms eller nedströms.
- 20 18. Kit enligt något av kraven 16-17, **kännetecknat** av att den fast förankrade reaktanten (Fångaren) har biospecifik affinitet mot analyten eller en analytrelaterad reaktant.
19. Kit enligt något av kraven 16-18, **kännetecknat** av att näm-
- 25 da en eller flera kalibratorzoner ligger uppströms DZ.
20. ~~Kit enligt något av kraven 16-19,~~ **kännetecknat** av att $A_P.Z$ ligger uppströms alla kalibratorzoner.

S A M M A N D R A G

Kit för att överföra uppmätta signalvärden för komplexbunden analytiskt detekterbar reaktant (=Reaktant*) till reala mängder analyt i ett prov i samband med att man utför en analysmetod, vilken utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner för att bestämma mängd analyt i ett prov för att bilda komplex innehållande Reaktant* i en mängd som är relaterad mängden analyt i provet. Kitet kännetecknas att det uppvisar:

- a) en flödesmatris, i vilken det finns ett område för processflöde för transport av Reaktant*, och att det i detta område finns
 - i. en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2 etc), som innehåller en till matrisen fast förankrad kalibrator, varvid mängderna kalibrator är olika för minst två kalibratorzoner och kalibratorn uppvisar bindningsställen till vilka Reaktant* kan binda, när Reaktant* transporteras genom en kalibratorzon, samt
 - ii. uppströms nämnda en eller flera kalibratorzoner en appliceringszon för Reaktant* ($A_R \cdot Z$), och
- b) Reaktant*, som eventuellt är fördeponerad i $A_R \cdot Z$.

Desutom beskrives användning av en kalibrator, som bundits i förväg till en matris, i samband med tester av ovan angivet slag, vid vilka det bildas komplex som är minst ternära.

THIS PAGE BLANK (USPTO)
